



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，

其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this office of the application as originally filed which is identified hereunder：

申請日：西元 2002 年 08 月 15 日

Application Date

申請案號：091118398

Application No.

申請人：食品工業發展研究所

Applicant(s)

局長

Director General

蔡練生

發文日期：西元 2003 年 7 月 21 日

Issue Date

發文字號：

09220726610

Serial No.

77-274

申請日期	
案 號	
類 別	

✓
A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	紅麴菌突變株及其於製備具降血壓活性發酵產物之用途
	英 文	MONASCUS PRUPUREUS MUTANTS AND THEIR USE IN PREPARING FERMENTATION PRODUCTS HAVING HYPOTENSIVE ACTIVITY
二、發明人	姓 名	1.陳彥霖 Yen-Lin Chen 2.黃英娥 Ing-Er Hwang 3.林明志 Ming-Chin Lin 4.陳建州 Chien-Cho Chen 5.袁國芳 Gwo-Fung Yuan
	國 籍	1-5.中華民國 R.O.C.
三、申請人	住、居所	1.桃園縣平鎮市新富二街18號13樓 2.高雄縣林園鄉溪州二路56巷32號 3.新竹縣芎林鄉光復街90巷10號 4.新竹市寶山路452巷22號 5.新竹市明湖路400巷45弄11號
	姓 名 (名稱)	食品工業發展研究所 Food Industry Research and Development Institute
	國 籍	中華民國 R.O.C.
	住、居所 (事務所)	新竹市食品路331號
	代 表 人 姓 名	劉廷英 Liu, Tin-Yin, Director

裝
訂
線

四、中文發明摘要(發明之名稱: 紅麴菌突變株及其於製備具降血壓活性醱酵產物之用途)

本發明係有關紅麴菌(*Monascus purpureus*)之突變株，其可用以生產製備具降血壓活性之發酵產物，且所得產物中桔黴素含量極低。

本發明同時提供利用此紅麴菌突變株製備具降血壓活性醱酵產物之方法，及該醱酵產物於降血壓之用途。

英文發明摘要(發明之名稱): MONASCUS PRUPUREUS MUTANTS AND
THEIR USE IN PREPARING FERMENTATION
PRODUCTS HAVING HYPOTENSIVE ACTIVITY

The invention relates to *Monascus purpureus* mutants, which are useful in the preparation of fermentation products having hypotensive activity with a very low amount of citrinin.

The invention also provides a process for preparing the fermentation products having hypotensive activity using the *Monascus purpureus* mutants, and the use of the fermentation products in lowering blood pressure.

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， ☐有 ☐無主張優先權

本案在向中華民國提出申請前未曾向其他國家提出申請專利。

有關微生物已寄存於：

寄存日期：

，寄存號碼：

食品工業發展研究所

2002年5月20日

CCRC930052

食品工業發展研究所

2002年5月20日

CCRC930053

五、發明說明 (1)

發明範圍

本發明係提供紅麴菌之突變株，及其用於製備降血壓活性物質之用途。

發明背景

近年來，高血壓等心血管疾病已成為為導致死亡之主要原因之一，且罹患此種疾病之人口亦逐年成長。由於高血壓為一種慢性疾病，患者必須長期服用降血壓藥物。根據日本1999年的統計資料顯示，日本一年降血壓藥物市場穩定維持在500億日圓，而與控制血壓相關的保健食品，其市場亦由1997年之14億日圓成長至1999年之72億日圓。故全世界對於具有降血壓活性之藥物或健康食品之需求，亦日益增加。

自古以來，紅麴菌屬已為中國之傳統食藥菌種，其亦廣泛使用於製造各種食品。日本公開特許專利第61197524號案發現麴菌屬(*Aspergillus*)及紅麴菌屬(*Monascus*)之代謝產物中含有可改善高血壓之物質。Kohama等人於1987年(*Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35:2484-2489)發現紅麴菌發酵液中之 γ 氨基丁酸(GABA)及乙醯膽鹼(Ach)具有降血壓之功效。日本公開特許專利第62298598號案則揭示由紅麴菌發酵液中收集降血壓物質之方法。日本公開特許專利第03090031號案係提供紅麴菌之改良培養基，以提升降血壓物質之產量。日本公開特許專利第2000279163號案係揭示利用紅麴菌製備之降血壓食品，其中含有 γ 氨基丁酸及葡萄糖胺。WO01/31048 A1號案係揭示將紅米以紅麴菌發酵後，

五、發明說明 (2)

由其中製備氧化氮供給組合物 (nitric oxide donor composition)，該組合物具有血管舒張及降血壓之功效。

Blanc等人於1995年(International Journal of Food Microbiology; 27, 201-213)發現紅麴菌會產生一種真菌毒素，桔黴素(citrinin)，而使紅麴色素之安全性受到重視。日本專利第7274978號案利用突變方法降低桔黴素之產生(低於1 ppm)，惟其產物係為紅色素，並非用於製備降血壓物質。

紅黴菌屬雖已廣泛用於製造降血壓物質，但其產物之桔黴素含量高，致所生產之醱酵產物有安全性上之考慮。

發明概要

本發明係提供一新穎之紅麴菌(*Monascus purpureus*)突變株，其可於無須加工處理之條件下，以價格低廉之天然原料，以固體或液體方式培養，直接生產具有降血壓活性之醱酵產物，且該產物之桔黴素含量甚低。

本發明並提供利用本發明紅麴菌株製備具有降血壓活性之醱酵產物之方法。

本發明另提供利用本發明新穎紅麴菌突變株所產生之醱酵產物所製得之醫藥組合物及食品添加劑。

本發明之詳細說明

本發明提供由紅麴菌(*Monascus purpureus*)突變衍生篩選出之紅麴菌株突變株。當此突變株於每公升含有再來米粉60克，大豆粉30克及 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5克之培養基中培養，而醱酵產物中 γ 胺基丁酸之濃度達0.03毫克/毫升時，其中桔黴素之含量小於1.0ppm，較佳為小於0.5 ppm，更佳為小於0.15

五、發明說明 (3)

ppm。

根據本發明，紅麴菌突變株之母株係為任意可產生之 γ 胺基丁酸之紅麴菌株。例如：可獲自台灣新竹食品工業發展研究所之紅麴菌 CCRC 31497(其相當於 ATCC 16375, CBS 280.34, IFO 4489)、CCRC 31498(其相當於 ATCC 16358, CBS 281.34, IFO 4486)、CCRC 31499(其相當於早期命名之紫紅麴(*Monascus anka*) ATCC 16360, CBS 283.34, IFO 4478, KFCC 11832)、CCRC 31501(其相當於 ATCC 16362, CBS 285.34, IFO 4485)、CCRC 31504(其相當於 16367, CBS 288.34, IFO 4484)、CCRC 31541(其相當於 ATCC 16379, IFO 5965)或 CCRC 31542(其相當於 ATCC 16365, CBS 109.07, IFO 4513)。

根據本發明，其中之突變株係指其對應於母株之基因序列，至少有一個核苷酸不同，而所改變之核苷酸序列可改變其細胞生理。本發明之突變株可藉由許多方法獲得，其包含以隨機突變(例如：化學突變劑、轉位子或放射線)之方式處理母株，或以核酸重組技術將母株基因之核苷酸序列中，取代、插入或刪除一或多個核苷酸(請參見如 Sambrook, J. Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.; Ausubel, R. M. 等人 (1995) Current protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York N.Y.)。再以篩選之方式選擇 γ 胺基丁酸產量較母株高，且桔黴素產量較母株低之突變株。

根據本發明紅麴菌突變株之較佳實施態樣，該紅麴菌突

五、發明說明 (4)

變株具有與紅麴菌 M022 及 M1033 相同之性質，其中紅麴菌 M022 已於 2002 年 5 月 20 日寄存於食品工業發展研究所，登錄編號為 CCRC 930052；且紅麴菌 M1033 株已於 2002 年 5 月 20 日寄存於食品工業發展研究所，登錄編號為 CCRC 930053。

根據本發明，利用紅麴菌突變株製備醱酵產物之方法，可於固體或液體培養基中醱酵進行。

根據本發明，其中上述培養基中之碳源及氮源可為任意之習知原料。其較佳為天然原料，其中碳源包括但不限定為再來米粉、玉米澱粉、米澱粉、小麥澱粉、葡萄糖、麥芽糖、蔗糖及甘油，或其組合；而氮源包括但不限定為大豆粉、黃豆蛋白、消化蛋白、酵母萃取物、玉米浸漬液、麩胺酸、氯化銨及硝酸鉀，或其組合。

根據本發明製備方法之較佳實施態樣，其中該培養基之 pH 值係介於 3 至 9，較佳為介於 5 至 7。

根據本發明，所製得之醱酵產物中具有降血壓活性物質，例如 γ 胺基丁酸、葡萄糖胺及乙醯膽鹼。其中 γ 胺基丁酸是中樞神經系統中主要抑制神經傳導之物質，與其有關之受體有 $GABA_A$ 及 $GABA_B$ ，於動物實驗中發現 $GABA_A$ 之活動會伴隨降血壓、抗痙攣及抗憂慮等生理現象之出現，許多實驗亦證明 γ 胺基丁酸具治療高血壓之活性，且許多降血壓藥物均係藉由控制 γ 胺基丁酸之量，以達降血壓之效果。故 γ 胺基丁酸含量可作為測定降血壓活性之重要指標。

本發明紅麴菌突變株所製得之醱酵產物中桔黴素之含量

五、發明說明 (5)

低於 1.0 ppm，較佳為小於 0.5 ppm，更佳為小於 0.15 ppm。

根據本發明，所製得之降血壓醱酵產物可直接作為醫藥組合物之活性成分或食品添加劑。醱酵產物中之降血壓活性物質可進一步藉由各種習知技術予以純化(例如：Kohama 等人 (Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1987, 35:2484-2489) 及日本公開特許專利第 62298598 號案所揭示之純化萃取方法)。

下述實施例僅係用於例示本發明，而非用以限定本發明。

實例 1：一般分析方法

(1) γ 胺基丁酸含量之分析

將 0.6 毫升菌株醱酵液與 0.6 毫升氯化鋇 (140mM) 混合均勻後，於 60°C 水浴下反應 30 分鐘，將該混合物離心。取出 0.1 毫升之上清液，將其與 50 微升 KOH (1M) 及 850 微升之水進行反應，5 分鐘後進行離心並保留其上清液備用。

將 550 微升之該上清液樣品加入 150 微升之 NADP (4mM)、200 微升之磷酸緩衝液 (pH8.6) 及 50 微升之 GABASE (2 單位/毫升)，經混合後立即利用分光光度計測量其 OD₃₄₀ 之吸光值，並記錄其結果；再於其中加入 50 微升之 α -氧代戊二酸，經反應 60 分鐘後，再次測量其 OD₃₄₀ 之吸光值，並計算反應前後 OD₃₄₀ 吸光值之差值。將此差值與 GABA 標準品比較後，計算其濃度。

(2) 桔黴素含量分析

係將菌株醱酵液以 HPLC 予以測定。其步驟包括先將 7 毫

五、發明說明 (6)

升醱酵液之pH值調整至3.5，待反應1小時後，再加入3毫升乙酸乙酯，30分鐘後收集該乙酸乙酯層，並重覆此添加乙酸乙酯及收集之步驟兩次。將此收集液乾燥。

以1毫升之甲醇溶解此乾燥之收集樣品後，將此甲醇溶液以0.2微米孔徑之濾膜過濾後，取10微升進行HPLC分析。其分析之條件如下：

管柱： μ Bondapak C₁₈ (10微米，Waters，來源地)
流速： 每分鐘1.0毫升
偵測儀： UV偵測儀(Waters photodiary assay 996，分析波長225-345毫微米)
移動相(梯度)： 0.8%磷酸：乙腈：2-丙醇為60：35：5至25：70：5
進行時間： 20分鐘
滯留時間： 11分鐘

經測得之數值與桔黴素標準品(Sigma)比較後，計算其濃度。

實例2：本發明突變株之誘發及篩選

將紅麴菌 CCRC 31499 接種於 PDA(融合形馬鈴薯 20%，葡萄糖(Bacto Dextrose)2%，瓊脂 2%)斜面上，於 30°C 下培養 7 天後，以無菌水將孢子洗下。將每毫升含有 10⁷ 以上孢子之收集液，以 UV 光照射 2 分鐘，經連續稀釋後塗抹於 PDA 平板上。於 30°C 下培養 2 至 3 天後，將其中之菌落接種於培養基(其每公升中含有再來米粉 60 克，大豆粉 30 克及 MgSO₄ · 7H₂O 5 克)，測試該所得突變株之穩定性，以及 γ 胺基丁酸

五、發明說明 (7)

及桔黴素之產量。

最後分離選出一穩定之突變株，命名為紅麴菌 M022。將該突變株接種於 PDA 斜面上，於 30°C 下培養 7 天後，以無菌水將孢子洗下。將此孢子接種 (5×10^5 個孢子) 於含有 50 毫升培養基 (每公升中含有再來米粉 60 克，大豆粉 30 克及 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 克) 之三角搖瓶中，於 30°C、150 rpm 下震盪培養 5 至 7 天後收集其醱酵液，並測量此醱酵液中 γ 胺基丁酸及桔黴素之含量，結果為每毫升醱酵液之 γ 胺基丁酸含量為 0.039 毫克，而桔黴素之含量為小於 0.15 ppm。於相同條件下，母株紅麴菌 CCRC 31499 醱酵液中 γ 胺基丁酸含量為每毫升 0.031 毫克，而桔黴素之含量為 2.1 ppm。

再將紅麴菌 M022 依上述方法進行突變篩選，結果獲得另一株突變株，命名為紅麴菌 M1033，其於培養基 (每公升中含有麵粉 80 克，酵母萃取物 10 克及麩胺酸 10 克) 培養後，醱酵液中 γ 胺基丁酸含量為每毫升 2.07 毫克，而桔黴素之含量小於 0.15 ppm。於相同條件下，紅麴菌 M022 醱酵液中 γ 胺基丁酸含量為每毫升 0.834 毫克，而桔黴素之含量為小於 0.15 ppm。

紅麴菌 M022 於培養基中之特徵如下：

CYA 培養基 (每公升中含有蔗糖 30 克， NaNO_3 3 克， K_2HPO_4 1.0 克， MgSO_4 0.5 克， KCl 0.5 克， FeSO_4 0.01 克酵母萃取物 1 克，瓊脂 15 克)

培養 7 天後，菌落呈橘黃色，大小為 11 至 14 毫米，氣生菌絲呈白色；

五、發明說明(8)

培養10天後，菌落呈橘黃色，大小為12至16毫米，氣生菌絲呈白色；

分生孢子柄呈無色，分支不規則；

分生孢子呈梨形，大小為 $3-4 \times 9.5-12.5$ 微米，平滑，壁厚約2微米；

於CYA培養基中培養21天，仍未發現有性世代。

MEA培養基(每公升含有麥芽萃取物20克，胰1克，葡萄糖20克，瓊脂15克)

培養7天後，菌落呈橘紅色，大小為28至30毫米，氣生菌絲呈白色；

培養10天後，菌落呈橘紅色，大小為34至37毫米，氣生菌絲呈白色；

分生孢子柄呈紅色，分支不規則；

於MEA培養基中培養21天，子囊果仍未完全成熟，子囊孢子呈卵形($4.5-5 \times 5-6$ 微米)。

紅麴菌M1033於培養基中之特徵如下：

CYA培養基(每公升中含有蔗糖30克， NaNO_3 3克， K_2HPO_4 1.0克， MgSO_4 0.5克，KCl 0.5克， FeSO_4 0.01克酵母萃取物1克)

培養7天後，菌落呈橘黃色，大小為13至14毫米，氣生菌絲短小且十分稀少；

培養10天後，菌落呈橘黃色，大小為17至18毫米，氣生菌絲短小且十分稀少；

分生孢子柄呈無色，不規則分支部分呈「之」字形分

五、發明說明 (9)

支，外壁平滑；

分生孢子呈梨形或橢圓形，大小為 $6-12 \times 8.5-13$ 微米；

子囊果大小為 $30-35$ 微米，子囊孢子呈卵形，大小為 $4.5-5 \times 5.5-6$ 。

MEA培養基(每公升含有麥芽萃取物20克，腺1克，葡萄糖20克，瓊脂15克)

培養7天後，菌落呈橘紅色，大小為29至30毫米，氣生菌絲短小且十分稀少；

培養10天後，菌落呈橘紅色，大小為41至42毫米，氣生菌絲短小且十分稀少；

分生孢子柄呈無色，分支不規則；

於MEA培養基中培養21天，子囊果仍未完全成熟。

有關本發明紅麴菌 M022 及 M1033 突變株與其母株 CCRC 31499 之比較顯示於下表 1。

表 1

	母株 CCRC 31499	突變株 M022	突變株 M1033
分生孢子大小 ^a	$8-12 \times 10-13$ 毫米	$3-4 \times 9.5-12.46$ 毫米	$6-12 \times 8.5-13$ 毫米
子囊果大小 ^a	37-45毫米	無	30-35毫米
子囊孢子大小 ^a	$4.5 \times 5-6$ 毫米	無	$4.5 \times 5.5-6$ 毫米
GABA(毫克/毫升)	0.031^b	0.039^b ; 0.834^c	2.07^c

五、發明說明 (10)

桔 黴 素 (ppm)	2.1 ^b	<0.15 ^b ; <0.15 ^c	<0.15 ^c
----------------	------------------	---	--------------------

^a 於CYA培養基中培養。

^b 培養基：每公升中含有再來米粉60克，大豆粉30克及
MgSO₄·7H₂O 5克。

^c 培養基：每公升中含有麵粉80克，酵母萃取物10克及
麩胺酸10克。

實例3：生產γ胺基丁酸之pH值

根據實例2所述之方法，以每公升中含有麵粉80克，酵母
萃取物10克及麩胺酸10克之培養基培養，分別測定於不同
pH值之條件下，發酵液中γ胺基丁酸及桔黴素之含量。表2
所示結果顯示紅麴菌M022及M1033突變株於不同之pH值條
件下，皆能產生高量之γ胺基丁酸，且桔黴素之含量皆非
常低(<0.15 ppm)。

表 2

起始pH(滅菌前)	滅菌後pH值	突變株M022 ^a	突變株M1033 ^a
pH 3.0	3.3	0.068	-
pH 4.0	4.5	0.377	0.568
pH 4.5		-	1.512
pH 5.0	5.4	0.465	2.141
pH 5.5		-	2.572
pH 6.0	5.8	0.867	2.728
pH 6.5		-	2.736

五、發明說明 (11)

pH 7.0	6.3	0.821	2.688
pH 8.0	6.9	0.585	-
pH 9.0	7.3	0.314	-

"-" 表未測試

^a γ 胺基丁酸之含量單位為毫克/毫升

* 桔黴素含量均低於檢測值 0.15 ppm

裝
訂
線

六、申請專利範圍

1. 一種紅麴菌 (*Monascus purpureus*) 突變株，其若於每公升含有再來米粉 60 克，大豆粉 30 克及 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 克之培養基中培養，當發酵產物中 γ 胺基丁酸之濃度為 0.03 毫克/毫升時，其中桔黴素之含量小於 1.0ppm。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之紅麴菌突變株，其係為紅麴菌 CCRC 31499 之突變株。
3. 根據申請專利範圍第 2 項之紅麴菌突變株，其具有紅麴菌 M022 菌株相同之性質，該紅麴菌 M022 係於 2002 年 5 月 20 日寄存於台灣新竹之食品工業發展研究所，寄存編號為 CCRC 930052；或具有紅麴菌 M1033 菌株相同之性質，該紅麴菌 M1033 係於 2002 年 5 月 20 日寄存於台灣新竹之食品工業發展研究所，寄存編號為 CCRC 930053。
4. 根據申請專利範圍第 3 項之紅麴菌突變株，其係紅麴菌 M022，其係於 2002 年 5 月 20 日寄存於台灣新竹之食品工業發展研究所，寄存編號為 CCRC930052。
5. 根據申請專利範圍第 3 項之紅麴菌突變株，其係紅麴菌 M1033，其係於 2002 年 5 月 20 日寄存於台灣新竹之食品工業發展研究所，寄存編號為 CCRC930053。
6. 一種製備發酵產物之方法，其係在適當之條件下培養根據申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之紅麴菌突變株，其中該發酵產物包含 γ 胺基丁酸且其桔黴素含量小於 1.0 ppm。
7. 根據申請專利範圍第 6 項之方法，其中該發酵產物具降血壓活性。

六、申請專利範圍

8. 根據申請專利範圍第6項之方法，其中該紅麴菌突變株係於固體或液體培養基中培養。
9. 根據申請專利範圍第8項之方法，其中該培養基之pH值係介於3至9。
10. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中該培養基之pH值係介於5至7。
11. 根據申請專利範圍第6項之方法，其中該醱酵產物之桔黴素含量小於0.5 ppm。
12. 根據申請專利範圍第11項之方法，其中該醱酵產物之桔黴素含量小於0.15 ppm。
13. 根據申請專利範圍第7項之方法，其中該醱酵產物可直接作為醫藥品之活性成分或食品添加劑。
14. 根據申請專利範圍第7項之方法，其可進一步包括純化降血壓活性成分之步驟，以得純化之降血壓活性成分。
15. 一種醫藥組成物，其係利用申請專利範圍第1至5項中任一項之紅麴菌突變株生產之醱酵產物製得，其中該醱酵產物中之桔黴素含量小於1.0 ppm。
16. 根據申請專利範圍第15項之醫藥組合物，其係用於降低血壓。
17. 根據申請專利範圍第15項之醫藥組成物，其中該醱酵產物之桔黴素含量小於0.5 ppm。
18. 根據申請專利範圍第17項之醫藥組成物，其中該醱酵產物之桔黴素含量小於0.15 ppm。
19. 根據申請專利範圍第15項之醫藥組成物，其係由申請專

六、申請專利範圍

利範圍第6至14項中任一項之方法製備得之醱酵產物製得。

20. 根據申請專利範圍第19項之醫藥組成物，其係將該醱酵產物再進一步純化而製得。
21. 一種食品添加劑，其係利用申請專利範圍第1至5項中任一項之紅麴菌突變株生產之醱酵產物製得，其中該醱酵產物中之桔黴素含量小於1.0 ppm。
22. 根據申請專利範圍第21項之食品添加劑，其具有降低血壓活性。
23. 根據申請專利範圍第21項之食品添加劑，其中該醱酵產物之桔黴素含量小於0.5 ppm。
24. 根據申請專利範圍第23項之食品添加劑，其中該醱酵產物之桔黴素含量小於0.15 ppm。
25. 根據申請專利範圍第21項之食品添加劑，其係由申請專利範圍第6至14項中任一項之方法製備得之醱酵產物製得。
26. 根據申請專利範圍第25項之食品添加劑，其係將該醱酵產物再進一步純化而製得。